

PUBLICATION NUMBER : 2003319734  
PUBLICATION DATE : 11-11-03

APPLICATION DATE : 02-05-02  
APPLICATION NUMBER : 2002130964

APPLICANT : JAPAN SCIENCE & TECHNOLOGY CORP;

INVENTOR : MIYAKE KENSUKE;

INT.CL. : A01K 67/027 A01K 67/00 C12N 15/09 G01N 33/15 G01N 33/50

TITLE : MD-2 GENE-MODIFIED MODEL NONHUMAN ANIMAL

ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for building a model nonhuman animal knocking out a gene which involves in a mechanism recognizing LPS (lipopolysaccharide) which is a component of a galea of a gram-negative bacterium cell wall, detecting invasion of a gram-negative bacterium and responding to the LPS and to provide a method for carrying out evaluation of a function of a genetic substance of various kinds of animals by using the model nonhuman animal, screening of a functionally active substance for development of medicines and diagnosis for elucidating a morbid state.

SOLUTION: A mouse deleting a MD-2 gene which is an associated molecule of Toll-like receptor 4 (TLR4) recognizing a membrane component LPS of the gram-negative bacterium is built to build a LPS unresponsive nonhuman model animal. The present invention provides the method for carrying out evaluation of a function of a genetic substance of various kinds of animals by using the model nonhuman animal such as the mouse, screening of a functionally active substance for development of medicines and diagnosis for elucidating a morbid state.

COPYRIGHT: (C)2004,JPO

**This Page Blank (uspto)**

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	ターミナル* (参考)
A 0 1 K 67/027		A 0 1 K 67/027	2 G 0 4 J
67/00		67/00	D 4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09	Z N A	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15		33/50	Z
33/50		C 1 2 N 15/00	Z N A A
		審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 13 頁)	

(21) 出願番号 特願2002-130964(P2002-130964)

(22) 出願日 平成14年5月2日 (2002. 5. 2)

(71) 出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72) 発明者 三宅 健介

東京都目黒区駒場3丁目6-15 東大駒場

第2宿舍202号

(74) 代理人 10010/984

弁理士 廣田 雅紀

Fターム(参考) 2G045 AA29 BB24 CB01 CB17

4B024 AA11 CA02 DA02 EA02 FA10

FA18 GA12 HA12

(54) 【発明の名称】 MD-2遺伝子改変モデル非ヒト動物

(57) 【要約】

【課題】 グラム陰性菌細胞壁外葉の構成成分であるLPSを認識してグラム陰性菌の侵入を察知し、応答する機構に関与する遺伝子をノックアウトしたモデル非ヒト動物を構築すること、及び該モデル非ヒト動物を用いての異種動物の遺伝子物質の機能の評価や、薬剤開発のための機能活性物質のスクリーニングや、病態解明のための診断を行う方法を提供すること。

【解決手段】 グラム陰性菌の膜成分LPS (lipopolysaccharide) を認識するToll-like receptor 4 (TLR4) の会合分子であるMD-2遺伝子を欠損したマウスを構築し、LPS不応答性モデル非ヒト動物を構築した。本発明は、このマウスのような、非ヒトモデル動物を用いての異種動物の遺伝子物質の機能の評価や、薬剤開発のための機能活性物質のスクリーニングや、病態解明のための診断を行う方法を提供することよりなる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 TLR4の会合分子であるMD-2をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損したことを特徴とするグラム陰性菌膜成分LPS不応答性モデル非ヒト動物。

【請求項2】 非ヒト動物が齧歯目動物であることを特徴とする請求項1記載のグラム陰性菌膜成分LPS不応答性モデル非ヒト動物。

【請求項3】 齧歯目動物がマウスであることを特徴とする請求項2記載のグラム陰性菌膜成分LPS不応答性モデル非ヒト動物。

【請求項4】 マウスが、MD-2遺伝子の全部又は一部の遺伝子フラグメントを、ポリAシグナルとマーカー遺伝子をもつプラスミドに置換してターゲティングベクターを構築し、該ターゲティングベクターを線状化した後、胚幹細胞に導入し、MD-2遺伝子機能を欠損した標的胚幹細胞を、マウスの胚盤腔中にマイクロインジェクションし、キメラマウスを作製し、このキメラマウスと野生型マウスとを交配させてヘテロ接合体マウスを作製し、かかるヘテロ接合体マウスをインタークロスすることによって得られるMD-2ノックアウトマウスであることを特徴とする請求項3記載のグラム陰性菌膜成分LPS不応答性モデル非ヒト動物。

【請求項5】 MD-2遺伝子の第1エクソンをネオマイシン耐性遺伝子で置換し、ジフテリア毒素遺伝子をMD-2遺伝子の3'末端につないで、ターゲティングベクターを構築したことを特徴とする請求項4記載のグラム陰性菌膜成分LPS不応答性モデル非ヒト動物。

【請求項6】 請求項1～5記載のグラム陰性菌膜成分LPS不応答性モデル非ヒト動物に、被検物質を導入或いは作用させ、その応答を測定・評価することを特徴とするグラム陰性菌膜成分LPS応答性物質の評価・スクリーニング方法。

【請求項7】 被検物質の導入が、ヒトMD-2遺伝子の塩基多型の導入であることを特徴とする請求項6記載のグラム陰性菌膜成分LPS応答性物質の評価・スクリーニング方法。

【請求項8】 請求項1～5記載のグラム陰性菌膜成分LPS不応答性モデル非ヒト動物に、異種動物のMD-2遺伝子を導入し、該モデル非ヒト動物に被検物質を作用させて、その応答を測定・評価することを特徴とするグラム陰性菌膜成分LPS応答性物質の評価・スクリーニング方法。

【請求項9】 異種動物のMD-2遺伝子が、ヒトのMD-2遺伝子であることを特徴とする請求項8記載のグラム陰性菌膜成分LPS応答性物質の評価・スクリーニング方法。

【請求項10】 請求項1～5記載のグラム陰性菌膜成分LPS不応答性モデル非ヒト動物に、異種動物のMD-2遺伝子を導入し、該モデル非ヒト動物にエンドトキ

シンショックを誘発して、その応答を測定・評価することを特徴とする異種動物MD-2遺伝子の非ヒト動物を用いた診断法。

【請求項11】 異種動物のMD-2遺伝子が、ヒトのMD-2遺伝子であることを特徴とする請求項10記載の異種動物MD-2遺伝子の非ヒト動物を用いた診断法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、TLR4 (Toll-like receptor 4) の会合分子であるMD-2をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損したグラム陰性菌膜成分LPS不応答性モデル非ヒト動物及びその利用方法に関する。

【0002】

【従来の技術】LPS (lipopolysaccharide) はグラム陰性菌細胞壁外葉の主たる構成成分で、免疫担当細胞ばかりでなく、血管内皮細胞、線維芽細胞など様々な細胞の活性化を誘導する。つまり、生体は分子或いは細胞レベルでLPSを認識することによって、グラム陰性菌の侵入を察知している。LPSを認識しシグナルを伝達する分子は、長い間検索されてきた結果、最近になってようやく明らかにされた。30年程前に見つかったC3H/HeJマウスはLPS低応答性を示すミュータントマウスである。同様なLPS低応答性を示すマウスとしてC57BL/10ScCrも報告されていたが、これらのマウスの原因遺伝子がポジショナルクローニングによってTLR4 (Toll-like receptor 4) であると同定された (Poltrak, A. et al., Science, 282, 2085-2088, 1998, Qureshi, S. et al., J. Exp. Med., 189, 615-625, 1999)。

【0003】TLR4は、ショウジョウバエにおいて真菌を認識し感染防御を誘導する分子Tollのヒト及びマウスホモログである (Rock, F. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 588-593, 1998)。長い間探し求められてきたLPS認識分子は、ハエからヒトにまで保存されている病原体認識分子の1つであることが確認された。しかしながら、LPS認識は多くの分子が関与するプロセスで、TLR4単独では説明できないことが明らかにされている。本発明者はTLR4のLPS認識を制御する分子として、RP105/MD-1、MD-2などを報告してきた。

【0004】LPS認識機構とTLRs (Toll-like receptors) の関係についても解明されてきた。LPSの活性中心はリピドAと呼ばれ、Nアセチルグルコサミン2分子に脂肪酸が結合したものである。リピドAにコア抗原、さらにO抗原とばれる糖類がつながったものがLPSである。LPSは低い濃度でもマクロファージ、B細胞、樹状細胞、好中球、血管内皮細胞、線維芽細胞など実に様々な細胞の活性化を誘導する。つまりこれらの

細胞はLPSを認識することができる。LPS認識機構は多くの分子が関わる複雑なプロセスである(実験医学Vol.19(2001)No.5, P81)。菌体上にあるLPSはまず、血清中のLPS結合タンパク質(LBP)によって外膜から遊離され、もう一つのLPS結合タンパク質であるCD14へ単体の形で転送される。(Wright, S. D. et al., Science, 249, 1431-1433, 1990; Pugen, J. et al., Immunity, 1, 509-516, 1994)。

【0005】CD14は血清タンパク質として血中に、或いは細胞表面タンパク質として単球、マクロファージ上に存在している。CD14/LPS複合体はLPS単独の場合に比べて、100~10,000分の1の低い濃度で細胞の活性化を誘導する(Wright, S. D., J. Immunol., 155, 6-8, 1995)。しかし、CD14は細胞質内ドメインをもたないためにLPSシグナルを細胞内へそれ自身では伝達することができない。そこでLPSシグナルを細胞内へ伝達するための新たなレセプター分子の存在が指摘され、検索が続けられていた。最近ようやくそのLPSレセプターの実体がTLR4であると同定された。

【0006】ハエのTollレセプターは、個体発生の際に腹側への分化誘導シグナルを伝達するレセプター分子として発見されたが、その後真菌感染を察知して感染防御反応を誘導する役割をもっていることが報告された(Le maitre, B. et al., Cell, 86, 973-983, 1996)。更に、Tollによく似た分子TLR (Toll-like receptor) をマウスやヒトももっていることが1997年に明らかにされ、その1つであるTLR4が長い間謎であったLPS/エンドトキシン認識分子であった。ところが、細胞株を用いた実験で、TLR4単独ではLPSを認識できないという結果が報告された。

【0007】マウスIL-3依存性細胞株Ba/F3やヒト腎臓由来293細胞株はそれ自身LPSに反応しないし、これらの細胞にヒトTLR4を発現させたトランスフェクタントもLPSに対する反応性は認められない。その理由としてLPS反応にはTLR4に加えて他の分子が必要である可能性が考えられた。本発明者はRP (radio-protective) 105の細胞外ドメインのLR (leucine-rich repeat) がTLR4のそれとよく似ていることに注目し、v-myb regulated geneの1つであるMD-1がRP105と会合するところから、TLR4もMD-1と会合するのではないかと考えた。しかしながら両方の遺伝子を細胞株に発現させ、免疫沈降で共沈降できるかどうかを調べたが有意な会合は検出できなかった。そこで、TLR4に会合するMD-1類似分子の存在を想定し、データベースで検索を行い、ヒト妊娠子宮由来の遺伝子を得ることに成功した(Shimazu, R. et al., J. Exo. Med., 189, 1777-1782, 1999、特開平2000-262290号公報)。

【0008】この分子はアミノ酸160個からなり、M

D-1とアミノ酸で約23%一致していることから、MD-2という名前をつけた。ヒトMD-2をマウスIL-3依存性細胞株Ba/F3に単独で発現させても細胞表面には検出されないが、TLR4と共発現させると細胞表面で検出されるようになり、しかもその分布を共焦点レーザー顕微鏡で比較したところほぼ一致していた。さらに、抗ヒトTLR4モノクローナル抗体(HTA125)でTLR4を免疫沈降すると、MD-2が共沈された。これらの実験結果から、RP105/MD-1と同様にTLR4/MD-2複合体も細胞表面上に発現していることが確認された。

【0009】TLR4/MD-2複合体によるLPS認識、シグナル伝達の機構を明らかにするために、TLR4のLPS認識におけるMD-2会合の役割が検討された。マウスIL-3依存性細胞株Ba/F3にヒトTLR4単独、或いはTLR4/MD-2複合体を発現させ、LPS刺激によるNF- $\kappa$ B活性化を、予めBa/F3細胞株に導入しておいたNF- $\kappa$ Bレポーター遺伝子を用いたルシフェラーゼアッセイで調べた結果、TLR4単独ではLPS刺激によるNF- $\kappa$ Bの活性化は検出されなかったが、TLR4/MD-2複合体を発現した細胞株はLPS応答性を示した。そこで、MD-2を共発現させることによって、獲得されたLPS応答がTLR4を介しているかどうかを確認するために、TLR4に対するモノクローナル抗体(HTA125)を加えたところ、LPS刺激によるNF- $\kappa$ B活性化が特異的に阻害された。(実験医学Vol.19(2001)、No.5, P83)。したがって、TLR4/MD-2複合体がLPSを認識し、シグナルを伝達していることが明らかになった。

【0010】上記するようなこれまでの結果は、全て細胞株を用いた実験であり、正常細胞においてTLR4/MD-2の発現やそのLPS認識について検討する必要があった。本発明者は新たに、マウスTLR4/MD-2複合体を特異的に認識するモノクローナル抗体(MTS510)の確立に成功した(Akashi, S. et al., J. Immunol., 164, 3471-3475, 2000)。この抗体を用いて腹腔マクロファージを染色したところ、TLR4/MD-2複合体の発現が確認された。また、LPS刺激で誘導される腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor; TNF)の産生をこの抗体は特異的に抑制した。更に、LPSで腹腔マクロファージを刺激すると、細胞表面上のTLR4/MD-2複合体の発現が低下した。この発現低下はng/mlという低濃度のLPS刺激でもみられるが、ペプチドグリカンなど他の病原体由来の物質による刺激では認められなかった。またCD14など他の細胞表面分子では同様な発現低下は認められず、TLR4/MD-2に特異的な現象であった(Nomura, F. et al., J. Immunol., 164, 3476-3479, 2000)。

【0011】これらの結果から、TLR4/MD-2は

正常マクロファージ表面上にも発現しており、LPSの認識やシグナル伝達を司っていることが明らかとなった。TLR4やMD-2はともに広範に発現されており、マクロファージばかりでなく、線維芽細胞や血管内皮細胞など、非免疫担当細胞においてもTLR4/MD-2複合体がLPS認識にかかわっている可能性がある。

【0012】以上のとおり、近年、グラム陰性菌細胞壁外葉の構成成分であるLPSを認識してグラム陰性菌の進入を察知し、応答する機構における、TLR4及びその会合分子であるMD-2の役割については、徐々にその解明が進んできた。しかし、これまでの結果は、遺伝子や細胞レベルの実験を主とするものであり、今後は解析の方向として、TLR4の病原体認識機構を更に分子レベルで明らかにするとともに、生体レベルの更なる解明が期待されている。

#### 【0013】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、グラム陰性菌細胞壁外葉の構成成分であるLPSを認識してグラム陰性菌の侵入を察知し、応答する機構の生体レベルでの解明を目的として、該機構関与遺伝子をノックアウトしたモデル非ヒト動物を構築すること、及び該モデル非ヒト動物を用いての異種動物の遺伝子物質の機能の評価や、薬剤開発のための機能活性物質のスクリーニングや、病態解明のための診断を行う方法を提供することにある。

#### 【0014】

【課題を解決するための手段】Toll-like receptor 4 (TLR4)はグラム陰性菌の膜成分LPS (lipopolysaccharide)を認識する。本発明者は、TLR4に会合する分子MD-2を取得し、TLR4によるLPS認識に重要であることを細胞株を用いて解明してきた。今回、上記課題を解決するためにMD-2遺伝子を欠損したマウスを構築し、そのマウスがLPSに全く応答しないことからMD-2が生体レベルでもLPS応答に必須の分子であることを確認した。本発明は、このマウスのような、非ヒトモデル動物を用いての異種動物の遺伝子物質の機能の評価や、薬剤開発のための機能活性物質のスクリーニングや、病態解明のための診断を行う方法を提供することによる。

【0015】本発明のMD-2遺伝子を欠損した非ヒトモデル動物は、特にLPSが関与する疾患の解明や治療法の開発に利用できるものである。即ち、リポ多糖(LPS; lipopolysaccharide)はグラム陰性細菌の膜構成成分の一つで強く免疫細胞、血管内皮細胞などを活性化させる。その強い活性のために多くの疾患との関連が指摘されている。特に重篤な疾患がエンドトキシンショックである。この疾患はLPSによる免疫系の活性化によってサイトカインが過剰に産生されることが原因で、ショック状態に陥る疾患であり、多くの場合死に至る。多くの

の疾患で制御しきれなくなった最後に、エンドトキシンショックで死亡することが多く、病院内での死因として重要である。エンドトキシンショック治療薬の開発は遅れているが、その原因としてLPSの認識機構そのものが明らかになっていなかったことが挙げられる。特に、LPSを認識し、活性化シグナルを伝達する分子は長い間謎であったが、最近その認識分子の本体がToll-like receptor 4 (TLR4)と、その細胞外ドメインに会合するMD-2によって構成されるTLR4/MD-2であることが明らかになった。

【0016】MD-2分子は、細胞外に分布する分子で、TLR4と会合する可能性も指摘されていたが、エンドトキシンショックに対する治療薬開発において、TLR4ばかりでなく、MD-2も標的分子となりうるかどうか、明らかにすることが重要であった。そのためには、生体内でMD-2がTLR4によるLPS応答にどれだけ寄与しているか明らかにする必要があった。本発明者は、今回、MD-2遺伝子改変マウス(MD-2遺伝子機能欠損(ノックアウト)マウス)を作製し、MD-2が欠損した状態におけるLPS応答を調べた。その結果、今までのところ、MD-2遺伝子機能欠損(ノックアウト)マウスのLPS応答は完全に欠損していた。また、エンドトキシンショックを誘発しても、MD-2ノックアウトマウスは抵抗性を示した。この結果はMD-2が生体内でのTLR4によるLPS認識、シグナル伝達に必須の分子であると同時に、エンドトキシン疾患の原因でもあることを示している。したがって、TLR4と同様にLPS関連疾患の新規治療薬開発のための標的分子となりうることをMD-2遺伝子機能欠損(ノックアウト)マウスが示したことになる。

【0017】本発明の遺伝子改変非ヒトモデル動物は、MD-2遺伝子機能を欠損させたものであるが、本発明の特徴として、マウスMD-2を標的分子とする利点として最も重要な点はLPSに特異的なことである。TLR4あるいはその下流のMyD88などのシグナル伝達分子を標的すると、多くのTLRと共通しているため、他のTLRへの影響を考慮する必要がある。その点、MD-2はTLR4に特異的であり、MD-2を標的とする薬剤においては他のTLRへの影響を心配する必要は無い。さらにMD-2はTLR4と異なり、アミノ酸160個と比較的小さく、また分泌タンパク質で膜貫通部位も持たない。そのため構造生物学的解析が比較的容易である。

【0018】本発明のMD-2遺伝子機能を欠損させた非ヒトモデル動物は、ペプチドや組換えタンパク質などを薬剤として開発する上で、特に有利である。MD-2を標的とする薬剤を開発する上で、重要なことはスクリーニングシステムである。例えば、動物実験を行う上で、MD-2ノックアウトマウスにヒトのMD-2を発現させることで、よりヒトに近い動物実験が可能とな

る。また、エンドトキシンショックへの感受性に関わるヒトMD-2の1塩基多型(SNIP)機能解析においてもMD-2ノックアウトマウスを利用することができる。MD-2遺伝子機能を欠損させたノックアウトマウスにいろいろなSNIPを持つヒトのMD-2を発現させ、エンドトキシンショックを誘発することで、それぞれのSNIPの評価が可能となる。このように、本発明のMD-2遺伝子機能を欠損させた非ヒトモデル動物は、LPSが関与する疾患の診断、治療法の開発に有利に利用することができるものである。

【0019】すなわち本発明は、TLR4の会合分子であるMD-2をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損したことを特徴とするグラム陰性菌膜成分LPS不応答性モデル非ヒト動物(請求項1)や、非ヒト動物が齧歯目動物であることを特徴とする請求項1記載のグラム陰性菌膜成分LPS不応答性モデル非ヒト動物(請求項2)や、齧歯目動物がマウスであることを特徴とする請求項2記載のグラム陰性菌膜成分LPS不応答性モデル非ヒト動物(請求項3)や、マウスが、MD-2遺伝子の全部又は一部の遺伝子フラグメントを、ポリAシグナルとマーカー遺伝子をもつプラスミドに置換してターゲッティングベクターを構築し、該ターゲッティングベクターを線状化した後、胚幹細胞に導入し、MD-2遺伝子機能を欠損した標的胚幹細胞を、マウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションし、キメラマウスを作製し、このキメラマウスと野生型マウスとを交配させてヘテロ接合体マウスを作製し、かかるヘテロ接合体マウスをインタークロスすることによって得られるMD-2ノックアウトマウスであることを特徴とする請求項3記載のグラム陰性菌膜成分LPS不応答性モデル非ヒト動物(請求項4)や、MD-2遺伝子の第1エクソンをネオマイシン耐性遺伝子で置換し、ジフテリア毒素遺伝子をMD-2遺伝子の3'末端につないで、ターゲッティングベクターを構築したことを特徴とする請求項4記載のグラム陰性菌膜成分LPS不応答性モデル非ヒト動物(請求項5)からなる。

【0020】また本発明は、請求項1～5記載のグラム陰性菌膜成分LPS不応答性モデル非ヒト動物に、被検物質を導入或いは作用させ、その応答を測定・評価することを特徴とするグラム陰性菌膜成分LPS応答性物質の評価・スクリーニング方法(請求項6)や、被検物質の導入が、ヒトMD-2遺伝子の塩基多型の導入であることを特徴とする請求項6記載のグラム陰性菌膜成分LPS応答性物質の評価・スクリーニング方法(請求項7)や、請求項1～5記載のグラム陰性菌膜成分LPS不応答性モデル非ヒト動物に、異種動物のMD-2遺伝子を導入し、該モデル非ヒト動物に被検物質を作用させて、その応答を測定・評価することを特徴とするグラム陰性菌膜成分LPS応答性物質の評価・スクリーニング方法(請求項8)や、異種動物のMD-2遺伝子が、ヒ

トのMD-2遺伝子であることを特徴とする請求項8記載のグラム陰性菌膜成分LPS応答性物質の評価・スクリーニング方法(請求項9)や、請求項1～5記載のグラム陰性菌膜成分LPS不応答性モデル非ヒト動物に、異種動物のMD-2遺伝子を導入し、該モデル非ヒト動物にエンドトキシンショックを誘発して、その応答を測定・評価することを特徴とする異種動物MD-2遺伝子の非ヒト動物を用いた診断法(請求項10)や、異種動物のMD-2遺伝子が、ヒトのMD-2遺伝子であることを特徴とする請求項10記載の異種動物MD-2遺伝子の非ヒト動物を用いた診断法(請求項11)からなる。

#### 【0021】

【発明の実施の形態】本発明は、グラム陰性菌の膜成分LPS (lipopolysaccharide) を認識するToll-like receptor 4 (TLR4) の会合分子であるMD-2をコードする遺伝子機能を染色体上で欠損させ、グラム陰性菌膜成分LPS不応答性モデル非ヒト動物を構築することによる。非ヒト動物としては、齧歯目動物が有利に利用され、該齧歯目動物としては、特にマウスが有利に用いることができる。MD-2をコードする遺伝子を取得するには、公知のMD-2遺伝子配列からプローブを作製し、該プローブを用いて、遺伝子ライブラリーからスクリーニングにより、全MD-2遺伝子或いは一部の遺伝子フラグメントを取得し、用いることができる。また、例えば、マウスMD-2遺伝子のように、市販の遺伝子クローン(ゲノムシステムズ社(St. Louis, MO))を用いることもできる。

【0022】MD-2遺伝子機能を欠損した非ヒトモデル動物を構築するには、MD-2遺伝子の全部又は一部の遺伝子フラグメントを、ポリAシグナルとマーカー遺伝子をもつプラスミドに置換してターゲッティングベクターを構築し、該ターゲッティングベクターを線状化した後、胚幹細胞に導入し、MD-2遺伝子機能を欠損した標的胚幹細胞を、非ヒト動物の胚盤胞中にマイクロインジェクションし、キメラ非ヒト動物を作製し、このキメラ非ヒト動物と野生型非ヒト動物とを交配させてヘテロ接合体非ヒト動物を作製し、かかるヘテロ接合体非ヒト動物をインタークロスすることによってMD-2ノックアウト非ヒト動物を得ることによる。本発明における実施例においては、ターゲッティングベクターの構築に際し、MD-2遺伝子の第1エクソンをネオマイシン耐性遺伝子で置換し、ジフテリア毒素遺伝子をMD-2遺伝子の3'末端につないで、ターゲッティングベクターを構築した。

【0023】本発明のグラム陰性菌膜成分LPS不応答性モデル非ヒト動物の作製方法を、MD-2遺伝子機能を欠損したノックアウトマウスを例にとりて説明する。市販の遺伝子クローン(ゲノムシステムズ社(St. Louis, MO))から入手したMD-2遺伝子クローンをサブ

クローンし、DNAシーケンシングにより特定したMD-2遺伝子クローン、を用意する。このMD-2をコードする遺伝子の全部又は一部をネオ遺伝子カセット等に置換し、3'末端側にジフテリアトキシンAフラグメント(DT-A)遺伝子や単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ(HSV-tk)遺伝子等の遺伝子を導入することによって、ターゲットベクターを作製する。

【0024】この作製されたターゲティングベクターを線状化し、エレクトロポレーション(電気穿孔)法等によってES細胞に導入し、相同的組換えを行い、その相同的組換え体の中から、G418やガンシクロピア(GANC)等の抗生物質により相同的組換えを起こしたES細胞を選択する。また、この選択されたES細胞が目的とする組換え体かどうかをサザンブロット法等により確認することが好ましい。その確認されたES細胞のクローンをマウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションし、かかる胚盤胞を仮親のマウスに戻し、キメラマウスを作製する。このキメラマウスを野生型マウスとインタークロスさせると、ヘテロ接合体マウス(F1マウス: +/−)を得ることができ、また、このヘテロ接合体マウスをインタークロスさせることによって、本発明のMD-2ノックアウトマウスを作製することができる。また、MD-2ノックアウトマウスにおいてMD-2が生起しているかどうかを確認する方法としては、例えば、上記の方法により得られたマウスからRNAを単離してノーザンブロット法等により調べたり、またこのマウスにおけるMD-2の発現をウエスタンブロット法等により調べる方法がある。

【0025】また、作出されたMD-2ノックアウトマウスがグラム陰性菌膜成分LPS不応答性であることは、例えば、急性反応期タンパク質である血清アミロイドA(SAA)の誘導、或いは、LPSで誘導したエンドトキシンショック下における生存、TNFやIL6のようなサイトカインの過剰産生の状況を測定することにより確認することができる。

【0026】本発明のグラム陰性菌膜成分LPS不応答性モデル非ヒト動物は、塩基配列のような被検物の導入や、ペプチドや組み換えタンパク質のような被検物質を作用させて、その応答を測定・評価することにより、LPS応答性物質の評価・スクリーニングを行い、MD-2を標的とする薬剤の開発に用いることができる。また、本発明のグラム陰性菌膜成分LPS不応答性モデル非ヒト動物は、ヒトMD-2遺伝子の塩基多型(SNIP)のような、異種動物のMD-2遺伝子を導入し、異種動物を用いて異種動物のMD-2遺伝子の機能解析を行うことができる。例えば、グラム陰性菌膜成分LPS不応答性モデルマウスに、いろいろなSNIPを持つヒトMD-2遺伝子を発現させ、エンドトキシンショックを誘発することで、それぞれのSNIPの評価が可能となる。

【0027】更に、本発明のグラム陰性菌膜成分LPS不応答性モデル非ヒト動物は、該動物に、異種動物のMD-2遺伝子を導入し、該モデル非ヒト動物にエンドトキシンショックを誘発して、その応答を測定・評価することにより異種動物MD-2遺伝子の診断を行うことができる。例えば、グラム陰性菌膜成分LPS不応答性モデルマウスに、ヒトのMD-2遺伝子を導入し、該モデルマウスにエンドトキシンショックを誘発して、その応答を測定・評価することにより、マウスを用いてヒトMD-2遺伝子の診断を行うことができる。

#### 【0028】

【実施例】以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

#### 【材料と方法】

(試薬、細胞、マウス) 大腸菌由来のリボ多糖(LPS)、その活性中心であるリビドA(サルモネラ菌由来)、リボタイコ酸(ブドウ球菌由来)はSigma社(St. Louis, MO)製のものを使用した。ブドウ球菌由来のペプチドグリカン(Fluka社製のものを使用した。オリゴDNAは北海道システムサイエンス社製のものを使用した。D-GalactosamineはSigma社製のものを使用した。

【0029】(MD-2ノックアウトマウス作製) MD-2遺伝子クローンはゲノムシステムズ社(St. Louis, MO)製のものを使用した。その遺伝子の第1エクソンをネオマイシン耐性遺伝子で置換した。ジフテリア毒素遺伝子はMD-2遺伝子の3'末端につないだ。線状にしたDNAをE14由来ES細胞に導入し、G418耐性で、ジフテリア遺伝子で死ななかったESクローンを得た。そのなかで、MD-2遺伝子が組み換えられたクローンを1個得た。このクローンを日本SLC社に送り、キメラマウス作製を依頼した。そのマウスをC57BL/6と交配し、ESクローン由来のヘテロ、さらにヘテロ同士の交配によりホモのマウスを得た。

【0030】(リバーストランスクリプターゼ-PCR(RT-PCR)) 骨髄由来マクロファージの全RNAを和光純薬工業社製のISOGENを用いて抽出し、それからcDNAを合成した。アクチン、MD-2、TLR4の遺伝子の増幅は以下のプライマーを用いて行った。プライマーの配列は、次のとおり：

mouse (m)  $\beta$ -actin-sense, 5'-GAGAGGGAATCGTCCGTGACATC-3'; 配列番号1  
m $\beta$ -actin anti-sense, 5'-GAATGTAGTTTCATGGATGCC-3'; 配列番号2  
mMD-2 sense, 5'-ATGTTGCCATTT-ATTCTCTTTTCGACG-3'; 配列番号3  
mMD-2 anti-sense, 5'-ATTGACATCACGGCGGTGAATGATG-3'; 配列番号4  
mTLR4 sense, 5'-TATCCACTGTAGCATTTCTGATATACC-3'; 配列番号5



mTLR4 anti-sense, 5'-CTCTGCTGTTTGCTCAGGATTCGAGGC-3'; 配列番号6

【0031】(B細胞精製、活性化) マウス脾臓B細胞は、DYNAL社製のDynaビーズに抗CD43抗体S7をつけたものを用いてT細胞を除去することで精製した。精製したB細胞は96穴プレートに $2 \times 10^5$ /ウェルで蒔き、LPSやRP105に対する抗体で刺激した。培養3日目にトリチウム標識のサイミジンを加え、6時間皿に培養した後にそのDNAをグラスフィルターに回収し、取り込まれたトリチウムのカウントを測定することで、増殖反応を測定した。

【0032】(樹状細胞の誘導、活性化) 骨髄細胞を24穴プレートに $1 \times 10^6$ /ウェルで蒔き、マウスGM-CSF存在下で6日間培養した後に、リビドA、CpGなどで刺激し、サイトカイン産生などを測定した。

【0033】(マクロファージの誘導、活性化) 骨髄細胞を10cmディッシュにM-CSF存在下で7日間培養した細胞を用いた。細胞を回収した後、リビドAやCpGで刺激し、サイトカインの産生を測定した。

【0034】(サイトカイン産生) ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) はBiosource International社製のキットを用いて行った。

【0035】(細胞の染色) 細胞は抗体で染色した後にフローサイトメーター(ベクトンディッキンソン社製、FACScan)を用いて解析した。

【0036】(胎児由来線維芽細胞の確立とレトロウィルスを用いた遺伝子導入法) マウス胎児由来線維芽細胞は約13.5日からの胎児から確立した。レトロウィルスを用いた遺伝子導入にはPLATE細胞(東大医科研、北村俊雄先生より分与)にベクターを導入してレトロウィルスの産生を誘導した。産生されたウィルスを胎児由来線維芽細胞に感染させることで、遺伝子を導入した。

【0037】(共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析) 3.5cmディッシュに蒔いておいた細胞をバッファーで洗い、3.7%ホルムアルデヒドで固定する。その後0.2%のTritonX-100で膜に穴をあけてからフラッグに対するビオチン化抗体とインキュベートする。細胞を洗った後にテキサスレッド標識ストレプトアビジンでフラッグを染色した。ゴルジ体、小胞体を染色するにはBODIPY FL-ceramide、ER-tracker (Molecular Probe社製)をそれぞれ用いた。共焦点レーザーはZeiss社のLSM 510を用いた。

#### 【0038】[実験結果]

(MD-2遺伝子改変マウスの作製) MD-2の免疫系における役割を明らかにするためにMD-2遺伝子改変マウスを作製した。MD-2遺伝子の第1エクソンはアミノ末端の37個のアミノ酸をコードするが、そのエクソンをネオマイシン耐性遺伝子に置き換えた(図1a)。ホモのマウスはサザンハイブリダイゼーションで

確認し(図1b)、そのマウスの骨髄から誘導したマクロファージでのMD-2 mRNAの発現をRT-PCRで調べても検出されなかった(図1c)。タンパク質の発現はMTS510というモノクローナル抗体で確認した。この抗体はTLR4に対する抗体であるが、TLR4単独には反応せず、TLR4/MD-2複合体にのみ反応する。この抗体で骨髄由来マクロファージを染色しても発現は検出されなかった(図1d)。MD-2の発現が欠損していてもRP105、MD-1、CD14の発現に異常は認められなかった(図1d)。MD-2は神経系や血液系の細胞に、発生初期からその発現が報告されている。MD-2ノックアウトマウスは健康に生まれ、肉眼的所見、フローサイトメトリーによる所見では特にこれらの臓器に異常は認められなかった。

【0039】(ビトロにおけるB細胞、マクロファージ、樹状細胞のLPS応答性) 脾臓からB細胞を精製し、リビドAで刺激し、B細胞活性化による細胞表面分子CD86の発現上昇と増殖反応を調べたところ、野生型のB細胞では反応が認められたが、MD-2欠損B細胞では全く反応しなかった。MD-2欠損B細胞はTLR9のリガンドであるCpGや抗RP105抗体には問題なく反応した(図2a~b)。次に骨髄細胞から誘導したマクロファージをリビドA、TLR2リガンドペプチドグリカン、TLR9リガンドCpGで刺激し、サイトカインの産生をELISAで測定した。MD-2欠損マクロファージは腫瘍壊死因子(TNF)もIL-6も産生しなかった(図3a)。またリポ多糖に対してはMD-2欠損マクロファージは反応しなかった。樹状細胞は自然免疫と獲得免疫の連携に重要な役割を持つ細胞である。骨髄細胞からGM-CSFで誘導した樹状細胞をリビドAで刺激した。野生型樹状細胞はIL-12を産生し、CD86やCD40の発現上昇を示したが、MD-2欠損樹状細胞はCpGに反応し、リビドAには反応しなかった(図3b、c)。

【0040】(ビボにおけるLPS応答) CD14はLPS応答に重要であるが、中にはTLR4に依存するが、CD14には依存しない反応もある。急性反応期タンパク質である血清アミロイドA(SAA)の誘導もそのひとつである。そこでSAAの誘導におけるMD-2の役割を調べてみた。MD-2ノックアウトマウスにLPSを投与し、血中のSAAの濃度を測定したところ、野生型マウスではSAAが誘導されたが、MD-2ノックアウトマウスでは誘導されなかった(図4a)。

【0041】次にエンドトキシンショックをLPSで誘導し、MD-2の役割を調べてみた。LPSと、その毒性を増幅させるガラクトサミンを同時に投与したところ、野生型マウスはすべて10時間以内に死亡したが、MD-2ノックアウトマウスはすべて生き残った(図4b)。エンドトキシンショックによる死亡としてTNFやIL-6などのサイトカインの過剰産生がその一因と

して挙げられる。そこで、LPSとガラクトサミン投与後に採血し、血中のサイトカインを測定したところ、野生型ではTNF、IL-6、IL-12の産生が誘導されたが、MD-2ノックアウトマウスでは産生が認められなかった(図4c)。大量のLPS単独投与でもエンドトキシンショックは誘導されるが、その系でもMD-2ノックアウトマウスは野生型マウスに比べて低反応性を示した(図4d)。最後にグラム陰性菌ネズミチフス菌の感染実験を行った。野生型マウスに比べてMD-2ノックアウトマウスは細菌感染に対する反応性が低くなり、細菌感染防御機能が低下する結果、ネズミチフス菌の感染により、死亡率が上昇した(図4e)。

【0042】(TLR4の細胞内分布におけるMD-2の役割) 本発明者は最近RP105の細胞表面への発現にMD-1が必須であることを報告した。MD-1とMD-2が類似していることを考慮するとMD-2もTLR4の細胞内での分布に影響している可能性がある。その点を明らかにするために胎児由来線維芽細胞(EF)細胞を確立し、TLR4遺伝子を導入して発現させ、その分布をTLR4につけておいたFLAGタグを染色することで調べた(図5; 参考写真1参照)。野生型EF細胞ではTLR4は細胞内の核周辺と細胞表面に検出された。細胞表面では興味深いことにLeading Edgeと呼ばれる部位にその発現が集中していた。一方MD-2欠損EF細胞では細胞表面への発現が認められず、核周辺の細胞内のみTLR4が検出された(図5a)。細胞内での局在を明らかにするためにゴルジ体、小胞体のマーカーとしてそれぞれセラミド、ERトラッカーによる染色を同時に行ったところ、MD-2欠損EF細胞は細胞内のゴルジ体に集積している事が明らかになった(図5b)。これらの結果はMD-2がTLR4の細胞内にお

ける分布の制御に重要な役割をなしていることを示している。

#### 【0043】

【発明の効果】グラム陰性菌細胞壁外葉の構成成分であるLPSを認識してグラム陰性菌の侵入を察知し、応答する機構における、TLR4及びその会合分子であるMD-2の役割については、徐々にその解明が進んできた。しかし、これまでの結果は、遺伝子や細胞レベルの実験を主とするものであった。本発明においては、グラム陰性菌の侵入を察知し、応答する機構に関与するMD-2遺伝子をノックアウトしたモデル非ヒト動物を構築することに成功し、TLR4会合分子であるMD-2の役割について生体レベルでの解明を可能とした。更に、本発明におけるMD-2遺伝子をノックアウトしたモデル非ヒト動物の構築により、該ノックアウト非ヒトモデル動物を用いて、異種動物の遺伝子物質の機能の評価や、薬剤開発のための機能活性物質のスクリーニングや、病態解明のための診断を行う方法の提供を可能とした。本発明のMD-2遺伝子をノックアウトしたモデル非ヒト動物の優れた点として、本発明においてはMD-2を標的分子としたので、例えばTLR4やその下流のMyD88などのシグナル伝達分子を標的とした場合のように他のTLRへの影響を考慮する必要がなく、LPSに特異的に標的を絞ることができるということである。したがって、本発明のノックアウト非ヒトモデル動物を用いた薬剤の開発に際しても、MD-2に特異的に作用する薬剤を開発することが可能で、薬剤開発上、有利となる。

#### 【0044】

##### 【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION

<120> Generation of MD-2 gene-modified mouse

<130> A211P02

<140>

<141>

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:mouse (m)-  
beta-actin-sense

<400> 1

gagaggga aa tcgtgcgtga catc

<210> 2

<211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:m-beta-actin  
           anti-sense  
 <400> 2  
 gaatgtagtt tcattgatgc c 21  
 <210> 3  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:mMD-2 sense  
 <400> 3  
 atgttgccat ttattctctt ttgcagc 27  
 <210> 4  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:mMD-2  
           anti-sense  
  
 <400> 4  
 attgacatca cggcgggtgaa tgatg 25  
 <210> 5  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:mTLR4 sense  
 <400> 5  
 tatccactgt agcatttctg atatacc 27  
 <210> 6  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:mTLR4  
           anti-sense  
 <400> 6  
 ctctgtgttt tgctcaggat tcgagge 27

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の実施例において、作製したMD-2遺伝子改変マウスの第1エクソン部の遺伝子構造（1a）、ホモのマウスのサザンハイブリダイゼーションの確認の結果（1b）、MD-2 mRNAの発現をRT-PCRで調べた結果（1c）、タンパク質の発現をモノ

クロナル抗体で確認した結果（1d）、MD-2の発現が欠損した場合の、RP105、MD-1、CD14の発現への影響（1d）を示す図である。

【図2】本発明の実施例において、作製したMD-2遺伝子改変マウスの脾臓から採取したB細胞のビトロにおけるLPS応答を試験した結果を示す図である。

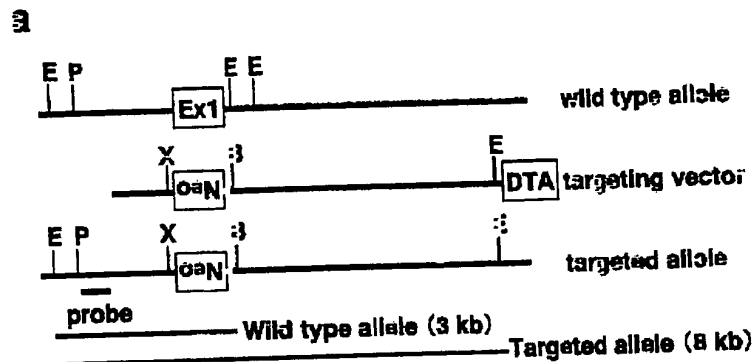
【図3】本発明の実施例において、作製したMD-2遺伝子改変マウスの骨髄細胞から誘導したマクロファージや樹状細胞のLPS応答を試験した結果を示す図である。

【図4】本発明の実施例において、作製したMD-2遺伝子改変マウスのヒポにおけるLPS応答試験において、SAA誘導の結果(4a)、ガラクトサミンを投与したエンドトキシンショック付与における生存の結果

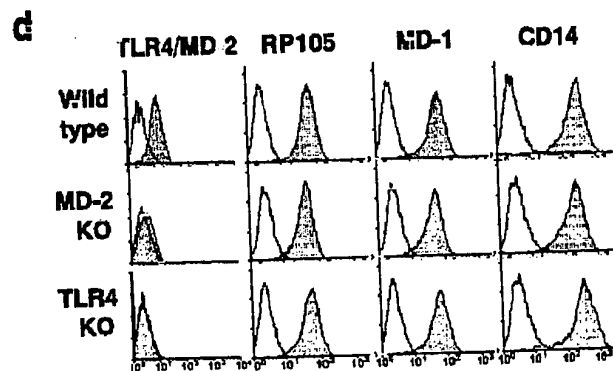
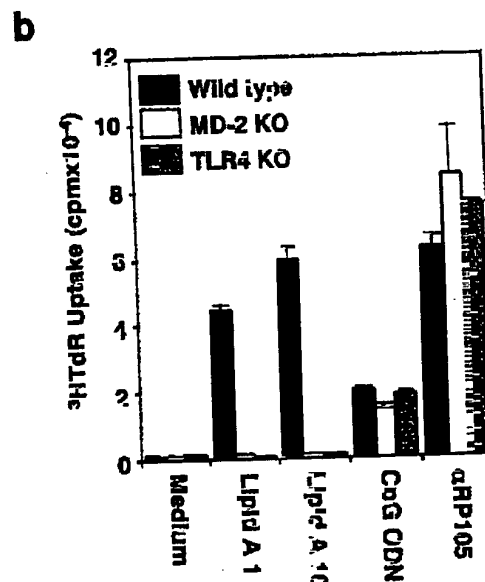
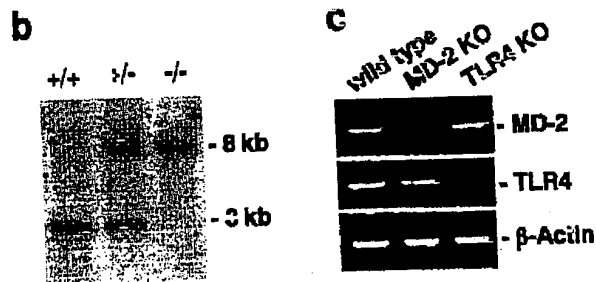
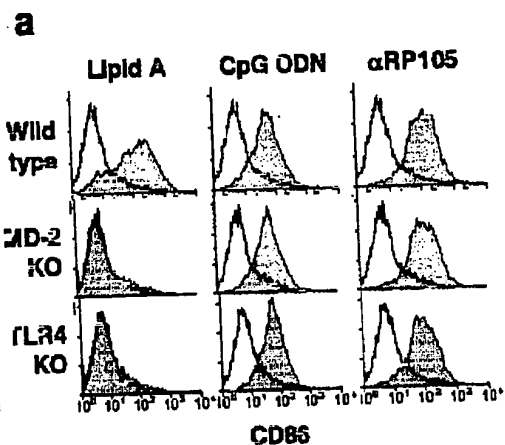
(4b)、血中のサイトカインを測定した結果(4c)、大量のLPS単独投与における生存率の野生型マウスとの比較の結果(4d~e)を示す図である。

【図5】本発明の実施例において、作製したMD-2遺伝子改変マウスから確立した胎児由来線維芽細胞におけるTLR4の局在を調べた結果である。野生型の線維芽細胞との比較(a)およびゴルジ体や小胞体のマーカーとの2重染色を示す(b)図である。

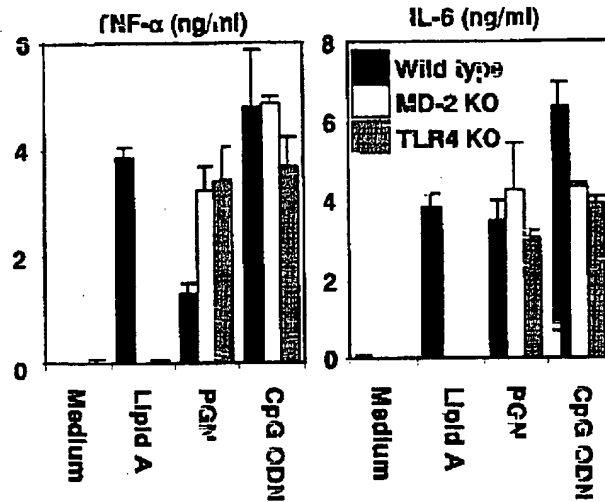
【図1】



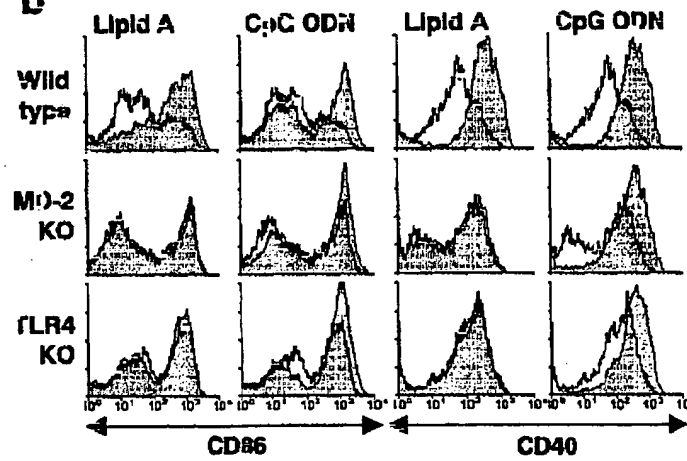
【図2】



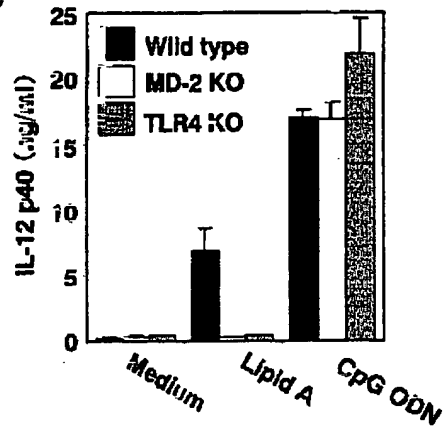
**a**

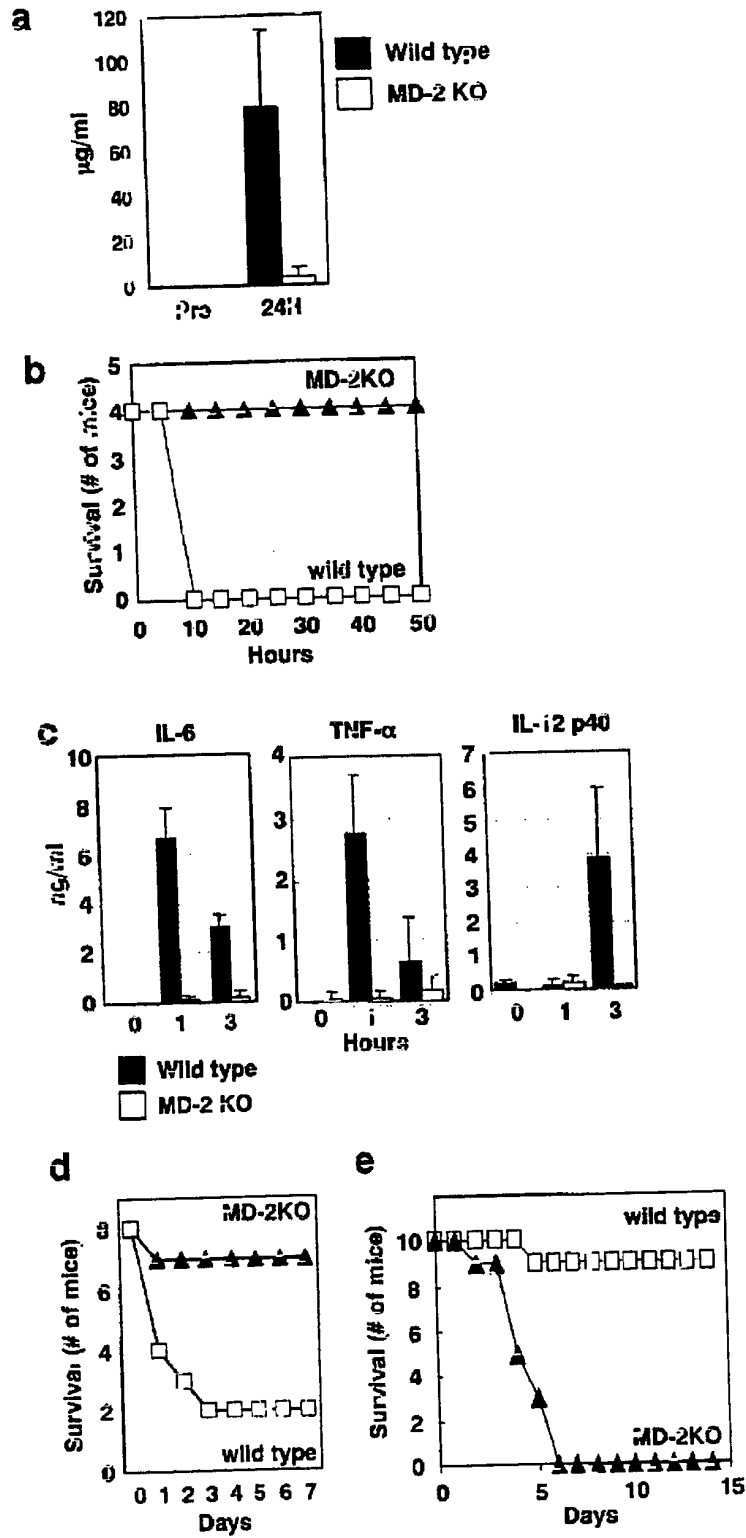


**b**

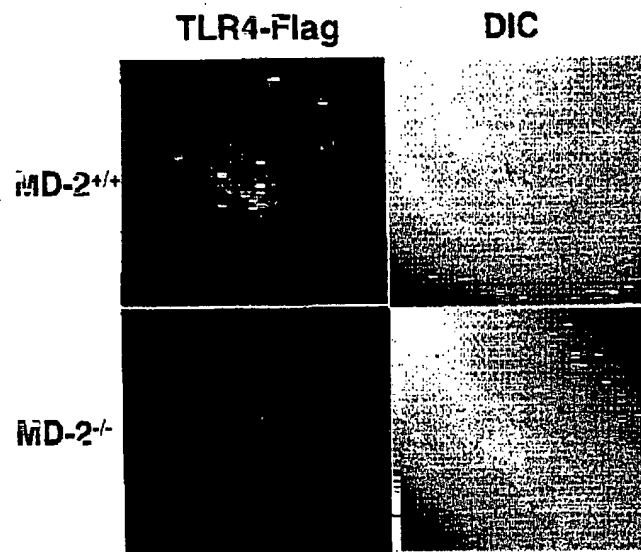


**c**

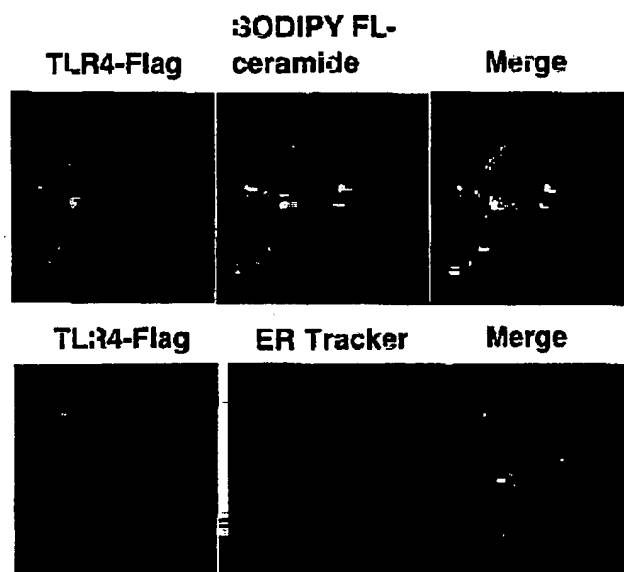




a



b



BEST AVAILABLE COPY

This Page Blank (uspto)